



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Croton hypoleucus* (Palo blanco)

Alumna
Márquez López Mónica
2162029050

Asesor
Dr. Moreno Rocha Luis Alfonso

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud.

Lugar de realización: Laboratorio 102 de Farmacocinética y Farmacodinamia del Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana.

10 de febrero de 2021 – 10 de agosto de 2021



Casa abierta al tiempo

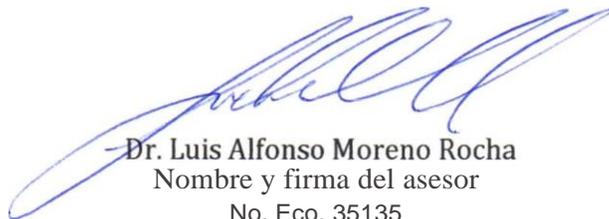
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

México, CDMX a 10 de agosto de 2021

MTRA. MARÍA ELENA CONTRERAS GARFIAS
DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna **Márquez López Mónica** con matrícula: **2162029050** concluyó el proyecto de Servicio Social: **“Efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Croton hypoleucus* (Palo blanco)”**, que se realizó en el laboratorio 102, “Farmacocinética y Farmacodinamia”, ubicado en el edificio N (UIDIS) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco de manera virtual del 10 de febrero al 10 de agosto del 2021, bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas. Sin más por el momento quedo a sus órdenes y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE



-Dr. Luis Alfonso Moreno Rocha
Nombre y firma del asesor
No. Eco. 35135

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	3
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
3 JUSTIFICACIÓN	4
4 MARCO TEÓRICO.....	5
4.1 Croton hypoleucus.....	5
4.2 Nocicepción.....	6
4.2.1 Procesos fisiológicos.....	6
4.2.2 Clasificación del dolor	12
4.3 Tratamientos farmacológicos.....	13
4.3.1 Analgésicos débiles	13
4.3.2 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)	14
4.3.3 Opioides.....	15
4.3.4 Fármacos adyuvantes.....	15
5 OBJETIVOS	16
5.1 General.....	16
5.2 Específicos..	16
6 MÉTODOS	16
6.1 Obtención del extracto.....	16
6.2 Animales de experimentación.....	16
6.3 Evaluación de la actividad antinociceptiva.....	17
6.4 Evaluación estadística	18
7 RESULTADOS.....	19
7.1 Evaluación de la actividad antinociceptiva.....	19
7.1.1 Tiempo acumulado de lamidas	19
7.1.2 Incidencia de sacudidas espontáneas	21
7.2 Evaluación estadística	24
8 DISCUSIÓN	26
9 CONCLUSIÓN	27
10 REFERENCIAS.....	28

1 INTRODUCCIÓN

El género *Croton* perteneciente a la familia de las Euphorbiaceae, está comprendido de una gran variedad de especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, que a lo largo del tiempo se han utilizado en la medicina tradicional; algunas especies han demostrado tener actividades antiinflamatorias, antinociceptivas, antioxidantes, entre otras (Zhao, et al., 2012). *Croton hypoleucus* es un arbusto endémico del estado de Hidalgo en México, se conoce popularmente como Palo blanco y ha sido utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de úlceras gástricas y dolor de estómago. Dentro de los metabolitos identificados de *C. hypoleucus* se encuentran clerodanos y crotonpenos, a los cuales se les atribuyen actividades biológicas (Velázquez-Jiménez, et al., 2018).

El dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular real o potencial; se clasifica de acuerdo con su etiología, intensidad, temporalidad, entre otros. Para el tratamiento del dolor existe una variedad de fármacos analgésicos, los cuales generalmente poseen efectos adversos indeseables. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) cuyo mecanismo de acción se basa principalmente en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, reducen el dolor y la inflamación, sin embargo, si son administrados de forma prolongada pueden producir efectos adversos, tales como: estreñimiento, dispepsia, hemorragias, perforaciones de la mucosa estomacal, entre otros. Los fármacos de tipo opioide generalmente poseen eficacia alta contra el dolor moderado a severo, sin embargo, son causantes de efectos indeseables dosis-dependientes (Abd-Elsayed & Deer T.R., 2019; López-Muñoz, et al., 2006).

La medicina tradicional, se ha utilizado a lo largo del tiempo y sigue siendo importante en la atención primaria de una gran parte de países en desarrollo (70-95%), incluía la medicina tradicional a base de hierbas (WHO, 2011); por lo tanto, la búsqueda de plantas medicinales que contengan metabolitos activos y que produzcan el menor número de efectos adversos ha tenido una gran importancia. En el presente trabajo se estudió el efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Croton hypoleucus*, administrado vía oral en modelos animales.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dolor representa el problema más común reportado tanto en el entorno clínico como en la población en general y su tratamiento ha sido una necesidad en la medicina mundial. El dolor nociceptivo generalmente se acompaña de inflamación, formando parte de los sistemas de protección, defensa o alarma que tiene el organismo. Se han publicado en guías internacionales, recomendaciones sobre el uso de tratamientos adecuados para el manejo del dolor, proporcionando información clínica basada en evidencia científica (Varrassi, et al., 2019). Actualmente, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son la clase de fármacos más utilizada a nivel mundial para el tratamiento del dolor y generalmente son administradas de manera prolongada, por lo tanto, desatan una serie de efectos indeseables sobre la mucosa gástrica, los riñones y los bronquios (Cordeiro, et al., 2016; Oliveira, et al., 2017). Existen otros tipos de fármacos para el tratamiento del dolor como los analgésicos débiles y los opioides, estos últimos generalmente generan efectos adversos dosis-dependiente.

3 JUSTIFICACIÓN

El tratamiento para el dolor es complejo y requiere de consideraciones clínicas importantes, sin embargo, debido a la frecuencia y severidad del dolor, los tratamientos actuales no son suficientemente satisfactorios (Varrassi, et al., 2019). La medicina tradicional se ha utilizado a lo largo de la historia, por lo tanto, la búsqueda de plantas medicinales que contengan metabolitos activos y que produzcan el menor número de efectos adversos ha tenido una gran importancia. Dentro de la diversidad en plantas medicinales se encuentra el género *Croton* el cual ha sido utilizado a lo largo del tiempo como antiinflamatorio, antiviral, antimicrobiano, entre otros. *Croton hypoleucus* (también llamado Palo blanco) es un arbusto endémico del estado de Hidalgo en México que ha sido utilizado en la medicina tradicional principalmente para el tratamiento de úlceras gástricas y dolor de estómago (Velázquez-Jiménez, et al., 2018). Se ha descrito la efectividad antinociceptiva de una gran variedad de especies de *Croton*; sin embargo, aún no se han realizado investigaciones para comprobar el efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Croton hypoleucus*.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 *Croton hypoleucus*

El género *Croton* pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, se conocen alrededor de 1300 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales y en México se han reportado 126 especies; estos se han utilizado a lo largo de los años como medicina tradicional en África, el sur de Asia y Sudamérica, por ejemplo, *Croton celtidifolius* ha demostrado tener actividad antiinflamatoria, antinociceptiva, antioxidante y ansiolítico (Velázquez-Jiménez et al., 2018; Zhao et al., 2012); las plantas pertenecientes a éste género son conocidas por los componentes como labdanos, clerodanos y furanoterpenoides principalmente, a los cuales se les atribuye una gran variedad de actividades biológicas, siendo objeto de futuras investigaciones (Xu et al., 2018).

Croton hypoleucus, popularmente conocido como Palo blanco y Soliman Liso, es un arbusto endémico del estado de Hidalgo, México y es utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de úlceras gástricas y dolor de estómago. No se han encontrado reportes sobre la actividad antinociceptiva de *C. hypoleucus*, sin embargo, se han identificado algunos metabolitos a los que se les atribuyen actividades biológicas como los clerodanos con anillo de furano: hypoleínas A-C, y crontonpenos A-B (Figura 1) (Urrutia -Hernandez, et al., 2019; Velázquez-Jiménez, et al., 2018).

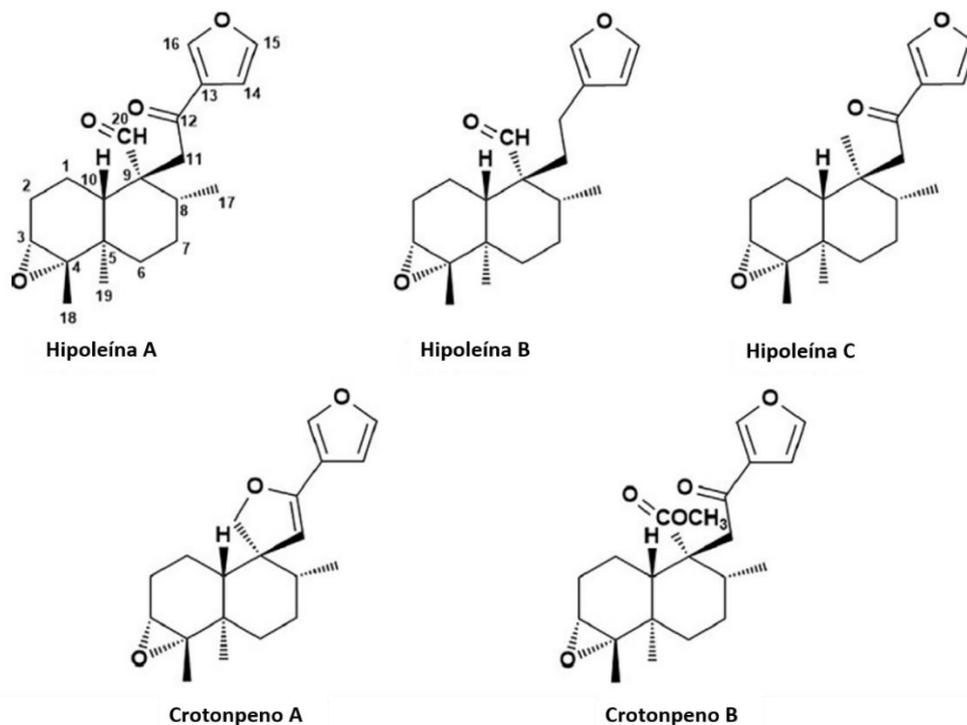


Figura 1: Estructura de hypoleínas A-C y crotonpenos A-B. Modificada de: Velázquez-Jiménez et al., 2018

4.2 Nocicepción

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define el dolor como: “Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial”. El término nocicepción deriva del latín *noci* (daño o lesión) y es útil para describir la respuesta neural a estímulos nocivos o traumáticos (Abd-Elsayed & Deer T.R., 2019; Orr, et al., 2017).

4.2.1 Procesos fisiológicos

La nocicepción implica cuatro procesos fisiológicos: transducción, transmisión, modulación y percepción.

4.2.1.1 Transducción

La transducción hace referencia al proceso mediante el cual los estímulos nocivos se transforman en un potencial de acción en las terminaciones nerviosas sensoriales. Las fibras aferentes primarias que se relacionan con la nocicepción reciben el nombre de nociceptores y la mayoría son terminaciones nerviosas libres

(fibras A δ y C); estas se pueden dividir en: mecanoreceptores, nociceptores silentes y nociceptores polimodales. Las fibras nerviosas periféricas se clasifican de acuerdo con la velocidad de conducción, diámetro y grado de mielinización (Tabla 1) (Abd-Elsayed & Deer T.R., 2019; Basbaum, et al., 2009).

Tabla 1. Clasificación de las fibras nerviosas periféricas

Fibras	Mielinización	Diámetro (μm)	Conducción	Función
A α	Si	12-20	70-120	Nervios motores Propiocepción
A β	Si	5-12	30-70	Tacto ligero Presión
A γ	Si	3-6	15-30	Tono del músculo esquelético Propiocepción
A δ	Si	2-5	12-30	Dolor rápido Tacto Temperatura
B	Si	<3	3-15	Fibras autonómicas preganglionares
C	No	0.5-1.5	0.5-2.6	Dolor leve Tacto Temperatura Fibras autonómicas preganglionares

4.2.1.2 Transmisión

El dolor se conduce a través de una vía de tres neuronas que transmiten el estímulo nocivo desde la periferia hasta la corteza cerebral (Figura 2).

- Neuronas de primer orden: se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal y pueden ascender varios segmentos en el tracto de Lissauer antes de hacer sinapsis con neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal.
- Neuronas de segundo orden: son neuronas nociceptivas específicas o de rango dinámico amplio (WDR), las primeras reciben únicamente estímulos nocivos y responden a estímulos de umbral alto, mientras que las neuronas WDR reciben información aferente no nociva de las fibras A β , A δ y C.
- Neuronas de tercer orden: están ubicadas en el tálamo y envían fibras a través de la cápsula interna a las áreas somatosensoriales I y II en la circunvolución postcentral de la corteza parietal y a través de la corona radiata a la pared superior del surco lateral.

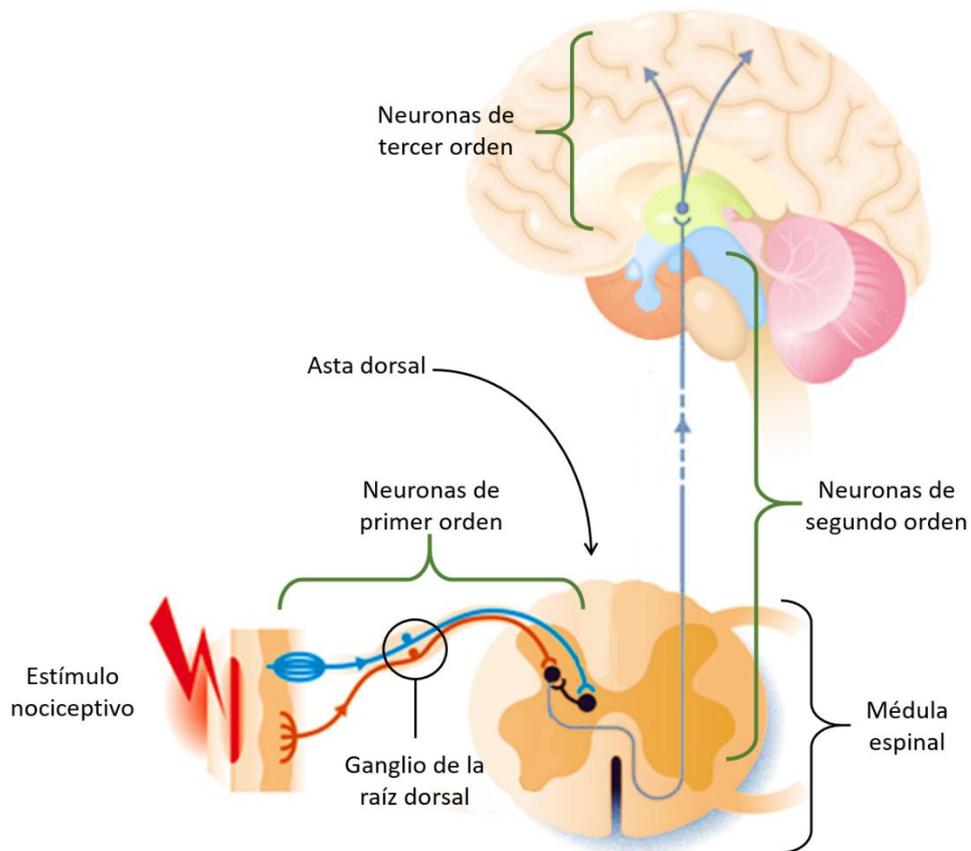


Figura 2: Transmisión del dolor por medio de la vía de tres neuronas, desde el estímulo nociceptivo hasta la corteza cerebral.

4.2.1.3 Modulación

La modulación del dolor ocurre de tres maneras distintas: periféricamente en los nociceptores, centralmente en la médula espinal o en estructuras supraespinales. Esta modulación puede inhibir o facilitar el dolor.

4.2.1.3.1 Modulación periférica

Los nociceptores y sus neuronas muestran sensibilización después de una estimulación repetida y da como resultado una disminución del umbral del dolor, disminución de la latencia del receptor, aumento de la frecuencia de respuesta al mismo estímulo y un disparo espontáneo incluso después de la cesación del estímulo.

La modulación periférica está mediada por la liberación y acumulación de mediadores neuroactivos (Figura 3); la histamina y serotonina (5-HT) se liberan de los mastocitos y las plaquetas, la bradicinina se libera de los tejidos posteriormente

a la activación del factor XII, activando las terminaciones nerviosas libres a través de receptores específicos ($\beta 1$ y $\beta 2$). Las prostaglandinas se producen por la acción de la fosfolipasa A2, para formar ácido araquidónico que posteriormente se convierte en endoperóxidos por la vía de la ciclooxigenasa los cuales se transforman en prostaciclina y prostaglandina E2 (PGE2). La PGE2 activa directamente las terminaciones nerviosas libres, mientras que la prostaciclina potencia la formación de edema por bradicinina. Los mediadores neuroactivos reducen el umbral de activación de la neurona por fosforilación mediada por la proteína cinasa A y C (PKA y PKC) de los canales de sodio TTX-r, dando como resultado el aumento en la capacidad de la célula para despolarizarse (Abd-Elsayed & Deer T.R., 2019, Basbaum, et al., 2009; Costigan & Woolf, 2000).

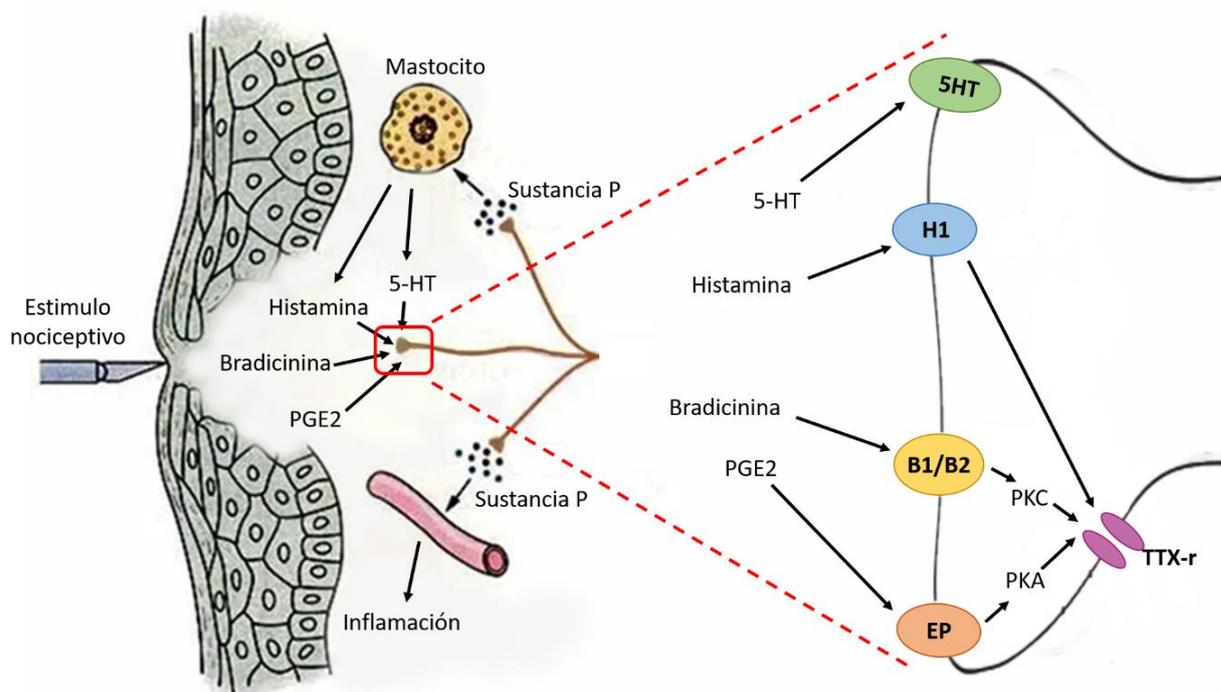


Figura 3: Modulación periférica de la nocicepción. Los mediadores neuroactivos liberados después del estímulo nociceptivo producen una cascada de señalización reduciendo el umbral de activación de la neurona por fosforilación de los canales de sodio TTX-r, mediada por PKA y PKC.

El papel de la inflamación neurogénica en la sensibilización periférica después de una lesión tisular se manifiesta como enrojecimiento alrededor del sitio de la lesión, edema tisular local y sensibilización a estímulos nocivos; se debe principalmente a

la liberación de sustancia P de los axones colaterales de las neuronas aferentes primarias (Abd-Elseyed & Deer T.R., 2019).

4.2.1.3.2 Modulación central

La modulación en la médula espinal es el resultado de la acción de neurotransmisores en el asta dorsal o de los reflejos espinales, que transmiten los impulsos eferentes de vuelta al campo nociceptivo periférico.

El trauma tisular puede alterar el umbral de excitación, así como la magnitud de la generación de potenciales de acción en los nociceptores periféricos o centrales. Esta transmisión aferente potenciada al asta dorsal de la médula espinal puede inducir a la hipersensibilización central o "Wind-up"; estos cambios en la neuroquímica, resultado de la estimulación repetitiva, la inhibición de las interneuronas y el reclutamiento de astrocitos y células microgliales, desempeñan un papel importante en la sensibilización central (Abd-Elseyed & Deer T.R., 2019).

Dentro de los neurotransmisores que participan en la modulación central se encuentra el glutamato que se une a receptores NMDA, AMPA y mGluR; cuando existe aumento de glutamato el receptor NMDA deja de ser bloqueado por el ion magnesio (Mg^{2+}) y, por lo tanto, incrementa el flujo de calcio (Ca^{2+}) intracelular, dando como resultado la activación de enzimas (ciclooxigenasas y lipoxigenasas) y cinasas (PKA y PKC). Las neuronas postsinápticas del asta dorsal pueden modular su propia actividad así como la de la neurona presináptica mediante la liberación de PGE2 y óxido nítrico (NO), respectivamente (Figura 4) (Costigan & Woolf, 2000).

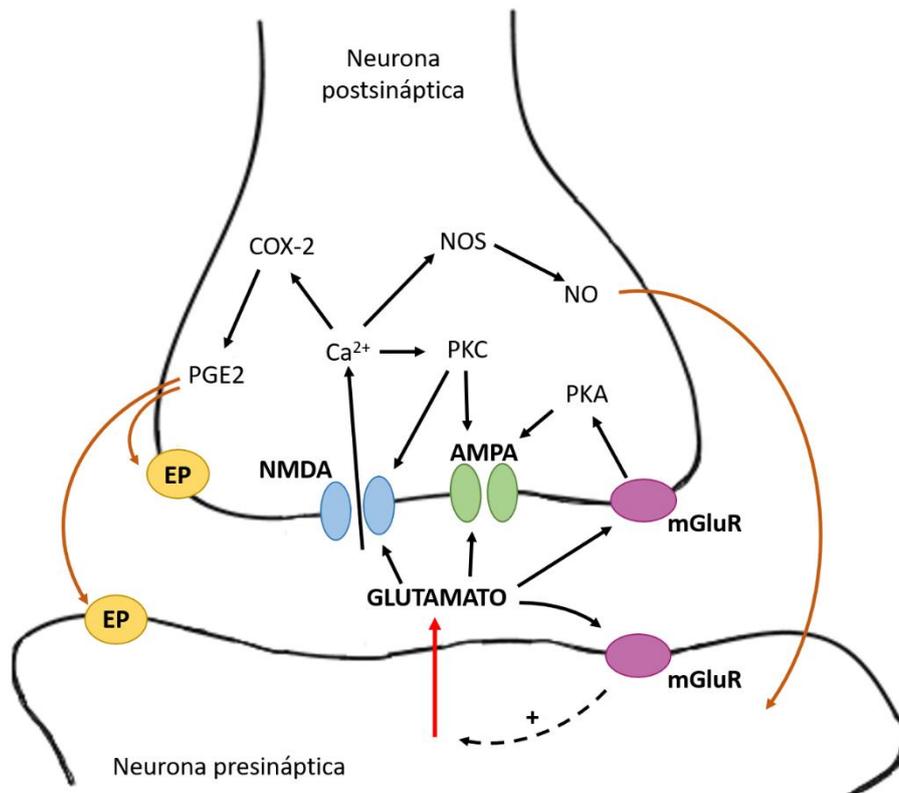


Figura 4. Modulación central del dolor. Sinapsis entre la neurona presináptica y la neurona postsináptica del asta dorsal, liberación de glutamato que da como resultado el inicio de la cascada de señalizaciones, iniciando la sensibilización central.

4.2.1.3.2.1 Inhibición

La transmisión de la nocicepción en la médula espinal puede inhibirse por la actividad segmentaria en la médula espinal o por la actividad neural descendente de los sitios supraespinales (Abd-Elseyed & Deer T.R., 2019).

i. Inhibición segmentaria

a. La activación de los mecanorreceptores A β de gran diámetro y bajo umbral inhibe la respuesta de las células del asta dorsal a los estímulos nociceptivos. La glicina y el GABA juegan un papel importante en la inhibición segmentaria y su antagonismo da como resultado una poderosa facilitación de las neuronas WDR, que pueden producir alodinia e hipersensibilidad.

ii. Inhibición supraespinal

b. Las estructuras supraespinales que envían fibras por la médula espinal para inhibir el dolor en el asta dorsal incluyen la sustancia gris central, la

formación reticular y el núcleo magno del rafe (NRM). Los axones de estos tractos actúan presinápticamente sobre neuronas aferentes primarias y postsinápticamente sobre neuronas de segundo orden; estas vías median su acción antinociceptiva a través de los mecanismos de los receptores adrenérgicos α_2 , serotoninérgicos y opiáceos (μ , δ y K).

4.2.1.4 Percepción

Este proceso requiere nocicepción y percepción con una respuesta emocional asociada; es el resultado de múltiples mecanismos pertenecientes al Sistema Nervioso Central que son diferentes fisiológica y anatómicamente, incluyendo conexiones talamocorticales y otras estructuras subcorticales como el eje hipotálamo-hipófisis, la amígdala, los ganglios basales y el tronco del encéfalo; así como del Sistema Nervioso Periférico, dando como resultado la inhibición o la facilitación del estímulo y la respuesta nociceptiva (Abd-Elsayed & Deer T.R., 2019; Wen, et al., 2020).

4.2.2 Clasificación del dolor

El dolor ha sido clasificado de acuerdo con diferentes aspectos, para facilitar su estudio, por ejemplo, de acuerdo con su etiología, temporalidad (agudo, crónico y episódico), intensidad y la clasificación fisiopatológica, siendo según la Organización Mundial de la Salud las más utilizadas (Orr, et al., 2017). Dentro de las clasificaciones, se encuentra la de Woolf (2010) la cual clasifica al dolor de acuerdo con los mecanismos que lo generen, describiendo tres tipos: nociceptivo, inflamatorio y patológico.

4.2.2.1 Dolor nociceptivo

Es un tipo de dolor de umbral alto que únicamente se activa en presencia de estímulos intensos; es un sistema de alerta temprana para detectar y minimizar el contacto con los estímulos nocivos. La información del estímulo intenso se transmite desde la periferia hasta el tálamo y la corteza cerebral, donde la sensación de dolor es percibida. Cuando el dolor nociceptivo se activa, el sistema anula la mayoría de las demás funciones neuronales (Woolf, 2010).

4.2.2.2 Dolor inflamatorio

Este dolor es causado por la activación del sistema inmunológico y la liberación de mediadores inflamatorios (metabolitos del ácido araquidónico, histamina, citocinas, entre otros), a causa de una lesión o infección tisular, ayudando a crear un estado en donde se evite el contacto físico o movimiento de la zona afectada hasta que se repare el daño tisular, finalice el proceso inflamatorio y desaparezca el dolor; este dolor también es adaptativo y protector (Woolf, 2010).

4.2.2.3 Dolor patológico

Es resultante del funcionamiento anormal del sistema nervioso, es decir, es un estado patológico del sistema nervioso, que puede ocurrir después de algún daño en el sistema nervioso, así como en condiciones donde no hay dolor inflamatorio; el dolor patológico es en la mayoría de los casos, la amplificación de señales sensoriales en el SNC y es un dolor de umbral bajo (Woolf, 2010).

4.3 Tratamientos farmacológicos

El tratamiento farmacológico para el dolor es complejo ya que se deben considerar las características del fármaco y del paciente; a pesar de la frecuencia y severidad del dolor, las opciones de tratamiento farmacológico no son satisfactorias. Los fármacos considerados para el tratamiento del dolor se dividen en 4 categorías principales: analgésicos débiles, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), opioides y fármacos adyuvantes. Estos fármacos se pueden combinar para potenciar su eficacia. (Varrassi, et al., 2019)

4.3.1 Analgésicos débiles

Dentro de los analgésicos débiles, el más utilizado es el paracetamol, a pesar de varios años de investigación, aún se desconoce el mecanismo de acción; se sabe y propone que es multidireccional, pero es necesario más investigación para aclararlo a fondo. En muchas guías el paracetamol, todavía es considerado como el analgésico de primera elección y suele ser el fármaco de preferencia para el tratamiento a largo plazo, esto se debe a su perfil de seguridad favorable, principalmente en el tracto gastrointestinal y su bajo costo (Przybyła, Szychowski & Gmiński, 2020; Varrassi, et al., 2019).

4.3.2 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Los AINE representan una opción farmacológica importante en el tratamiento del dolor inflamatorio; en esta categoría se encuentran el ibuprofeno, diclofenaco y ketoprofeno, entre otros. No todos los AINE tienen el mismo perfil farmacocinético ni espectro de eficacia contra diferentes tipos de dolor, sin embargo, todas las acciones están mediadas por el mismo mecanismo de acción: bloquean la producción de prostaglandinas (PG) inhibiendo ambas formas de ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). Estos fármacos se deben elegir de acuerdo con las características de cada paciente, tomando en cuenta comorbilidades y factores de riesgo (Varrassi, et al., 2019; Sarzi-Puttini, et al., 2013).

Se han descrito diversos efectos adversos en el tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos. Los AINE específicos de COX-2 son más seguros para el tracto gastrointestinal, sin embargo, recientemente se ha observado el riesgo de enfermedad trombotica cardiovascular; los AINE que inhiben la COX-1 que resulta en la supresión de prostaglandinas son los responsables principales del daño gástrico (Mizushima, 2008; Iwakiri, 2007)

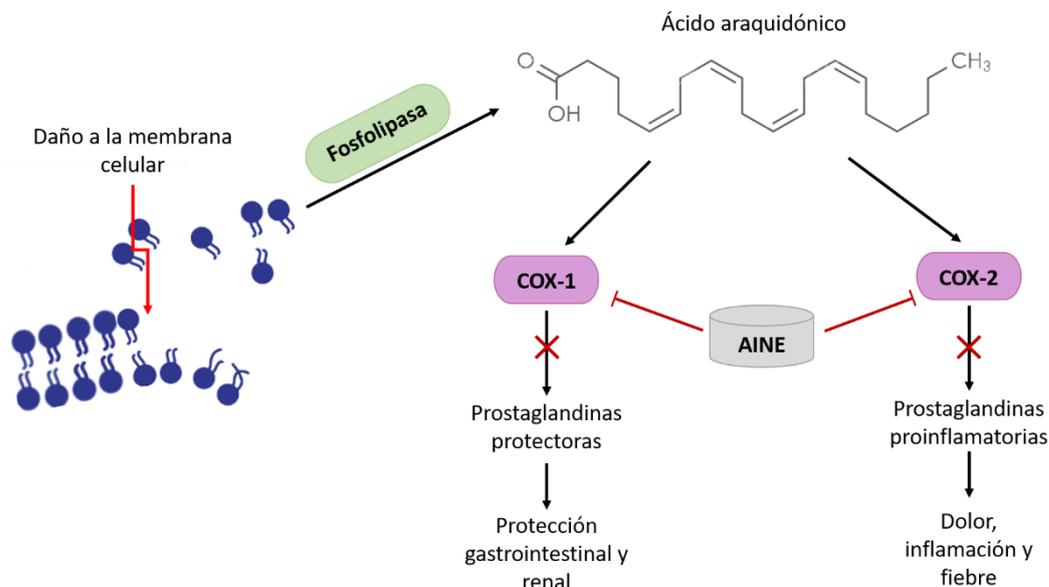


Figura 5. Representación esquemática del mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos.

4.3.3 Opioides

Los opioides se han considerado como los analgésicos más eficaces para el dolor por cáncer, sin embargo, no hay evidencia convincente para el dolor crónico no relacionado con el cáncer, a pesar de que la prescripción de estos fármacos se ha vuelto frecuente en Estados Unidos, Canadá y Australia. Los opioides pueden ejercer su acción en diferentes pasos de la cascada inflamatoria al unirse a los receptores opioides (Varrassi, et al., 2019).

La morfina es el tipo más común de fármaco opioide, sin embargo, se han descubierto varios fármacos como: hidromorfona, oxycodona, metadona, meperidina y fentanilo, entre otros. El efecto adverso más común de estos fármacos es el estreñimiento ya que en el tracto gastrointestinal se encuentran receptores opioides dando como resultado el ralentizamiento de los intestinos (Fishman, 2005).

4.3.4 Fármacos adyuvantes

Dentro de estos fármacos se encuentran los fármacos antidepresivos ya que existe una relación entre el dolor inflamatorio, el dolor crónico y la depresión ya que los agentes proinflamatorios parecen inducir depresión, por lo tanto, el tratamiento con fármacos antidepresivos ejercerá una amplia gama de acciones farmacológicas, así como un efecto antiinflamatorio. Los fármacos antiepilépticos son generalmente utilizados como adyuvantes en condiciones de dolor crónico y los corticoesteroides son utilizados para el tratamiento de condiciones de dolor, incluyendo el dolor inflamatorio ya que son una alternativa segura y eficaz para el tratamiento del dolor cuando los AINE no son bien tolerados (Varrassi, et al., 2019).

5 OBJETIVOS

5.1 General

Analizar los resultados obtenidos en la evaluación del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Croton hypoleucus*.

5.2 Específicos

1. Analizar la estandarización y aplicación del modelo de evaluación antinociceptiva de formalina en ratas Wistar mediante el empleo de diferentes dosis de diclofenaco y vehículo.
2. Analizar los resultados obtenidos durante la evaluación de la actividad antinociceptiva del extracto etanólico de *Croton hypoleucus* mediante la prueba de formalina a diferentes dosis.
3. Obtención de la curva dosis respuesta y los parámetros farmacodinámicos correspondientes.

6 MÉTODOS

Se analizaron los resultados obtenidos en ensayos anteriores comprendidos en el periodo de octubre de 2018 a enero de 2020, de acuerdo con la siguiente metodología.

6.1 Obtención del extracto

El extracto etanólico de *C. hypoleucus* fue proporcionado por el Laboratorio de Farmacia, del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Hidalgo.

6.2 Animales de experimentación

La evaluación del extracto se realizó en rata macho de cepa Wistar, con un peso de 180 a 200 gramos, mismas que tuvieron acceso libre a agua y alimentos antes de cada experimento. Los animales fueron facilitados por la Unidad de Producción y Experimentación Animal (UPEAL-Bioterio) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Todos los experimentos se realizaron siguiendo

los Lineamientos y Estándares para la investigación del Dolor en Animales (De Aluja, 2002; National-Research-Council, 2010; Zimmermann, 1983). Adicionalmente, el estudio fue sometido para su aprobación ante el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de la UPEAL-Bioterio. Cada animal fue utilizado una vez y sacrificado en una cámara de CO₂ al final de cada experimento.

6.3 Evaluación de la actividad antinociceptiva

Para la evaluación de la actividad antinociceptiva, se empleó la prueba de la formalina en rata (Bardin, Tarayre, Koek & Colpaert, 2001), ya que es un modelo útil para la detección de nuevos compuestos, debido a que abarca los mecanismos inflamatorios, neurogénicos y centrales de la nocicepción.

Dicha prueba se llevó a cabo en una cámara de observación individual de acrílico transparente de 30x30x60 cm. Se colocó un espejo detrás de la caja para permitir la observación del animal sin obstrucciones y el comportamiento de la rata se registró en vídeo para su posterior consulta. Treinta minutos posteriores a la administración del extracto, los animales conscientes recibieron una inyección subcutánea de 100µL de solución de formalina al 1% en la superficie plantar de la pata trasera derecha con aguja de calibre 26. La formalina fue preparada a partir de una solución de formaldehído al 37% disponible comercialmente y diluida en solución salina isotónica. Los animales fueron colocados posteriormente en las cámaras de observación individuales.

Las conductas relacionadas con el estímulo nociceptivo fueron cuantificadas mediante la determinación de la incidencia de sacudidas espontáneas de la pata inyectada o el tiempo acumulado de lamidas de la pata inyectada (frecuencia de sacudidas/lamidas). Se determinaron las conductas nociceptivas cada 5 minutos, determinando las frecuencias de dicho comportamiento. Los datos se registraron para la fase aguda temprana (Fase 1) durante un periodo de 0 a 10 minutos después de la inyección y la fase tónica tardía (Fase 2) durante un periodo que comprende de los 10 a los 60 minutos posteriores a la inyección de formalina.

El tiempo de lamida y el número de sacudidas obtenidos en la prueba fueron tratados por separado calculando el área bajo la curva (ABC) de las fases 1 y 2 de

la prueba. Se calculó el porcentaje de inhibición de todas las curvas. La actividad nociceptiva se evaluó con el cálculo del porcentaje de inhibición con la siguiente fórmula ocupando las medias de los distintos grupos:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{ABC_{vehículo} - ABC_{tratamiento}}{ABC_{vehículo}} \right) \times 100$$

Las observaciones se graficaron con el número de sacudidas y el tiempo de lamidas en función del tiempo y se compararon con el control y con el fármaco de referencia (diclofenaco).

6.4 Evaluación estadística

Se construyeron curvas graficando el tiempo acumulado de lamida en función del tiempo, así como el número de sacudidas en función del tiempo y se calcularon las áreas bajo la curva de cada dosis empleada. Los resultados de la evaluación fueron expresados como la media aritmética de los valores \pm error estándar de la media (SEM), se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los grupos, así como la prueba complementaria de Tukey para comparaciones múltiples. Los resultados con una $p < 0.05$ se consideraron significativos.

7 RESULTADOS

7.1 Evaluación de la actividad antinociceptiva

En el modelo de formalina en rata, la inyección subcutánea de 100 μ L de solución de formalina al 1% en la superficie plantar produce una respuesta nociceptiva que se caracteriza por la sacudida espontánea, así como lamidas en la pata inyectada; en este modelo, la disminución en el número de sacudidas y de tiempo de lamida se interpreta como efecto antinociceptivo.

7.1.1 Tiempo acumulado de lamidas

Al graficar el tiempo promedio acumulado de lamidas en función del tiempo, se obtuvo el curso temporal de cada dosis empleada, dando como resultado la figura 6 donde se observan los resultados obtenidos del grupo control, diclofenaco (17.8, 31.6, 56.2 y 100 mg/kg) y el extracto etanólico de *Croton hypoleucus* (31.6, 56.2, 100, 117.8, 177.8 y 316.2 mg/kg). La administración oral del extracto etanólico de *Croton hypoleucus* a diferentes concentraciones, demostró disminución en el tiempo acumulado de lamidas principalmente en la fase agua y al inicio de la fase tónica, con respecto al grupo control y a los grupos tratados con diclofenaco.

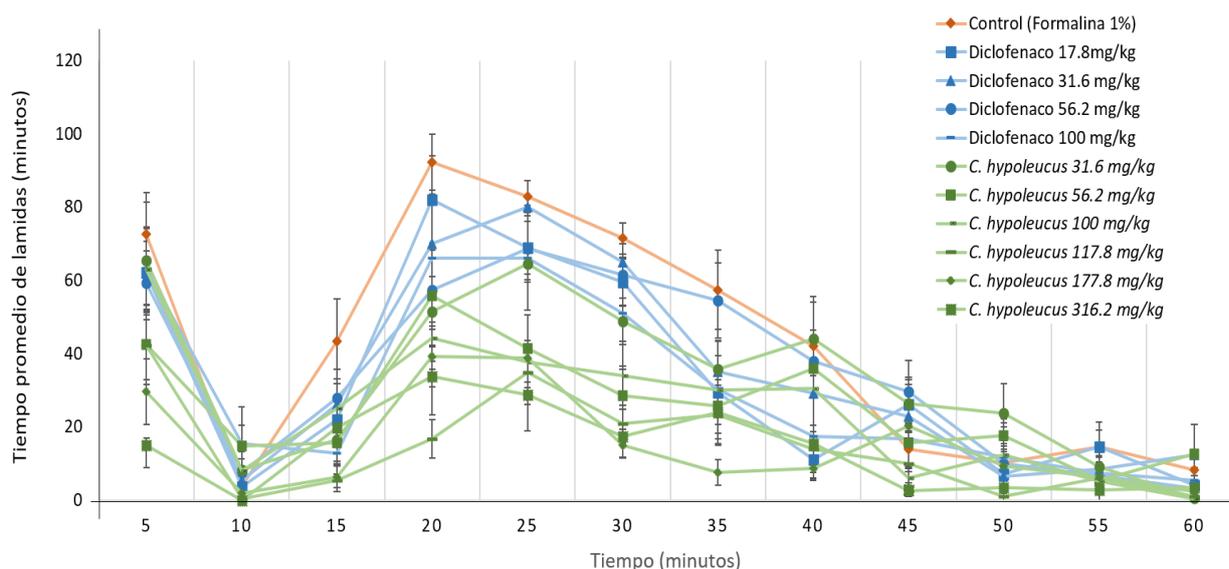


Figura 6. Cursos temporales de las administraciones de los diferentes tratamientos administrados.

Control en rojo (formalina 1%), diclofenaco en azul (17.8, 31.6, 56.2 y 100 mg/kg) y el extracto etanólico de *Croton hypoleucus* en verde (31.6, 56.2, 100, 117.8, 177.8 y 316.2 mg/kg). Los datos se expresan como promedios \pm error estándar de ocho lecturas individuales.

Al calcular el área bajo la curva (ABC) del curso temporal en la fase tónica tardía (10-60 minutos), se pudo observar de manera gráfica el efecto antinociceptivo de cada tratamiento administrado, dando como resultado la figura 7 donde se observa que el grupo control es el grupo con mayor ABC (2050.38 ± 85.9). Los grupos tratados con diclofenaco (17.8, 31.6, 56.2 y 100 mg/kg) mostraron una respuesta antinociceptiva, dando como resultado la disminución en cada grupo del ABC con respecto al grupo control (1557.93 ± 93.02 , 1680.85 ± 105.13 , 1707.51 ± 138.65 , 1378.27 ± 208.14 , respectivamente). Los grupos tratados con el extracto etanólico de *C. hypoleucus* (31.6, 56.2, 100, 117.8, 177.8 y 316.2 mg/kg) mostraron disminución en el área bajo la curva con respecto al grupo control (1559.21 ± 166.23 , 1199.35 ± 182.99 , 1063.98 ± 197.21 , 648.99 ± 130.32 , 746.33 ± 61.64 , 696.56 ± 183.53 , respectivamente).

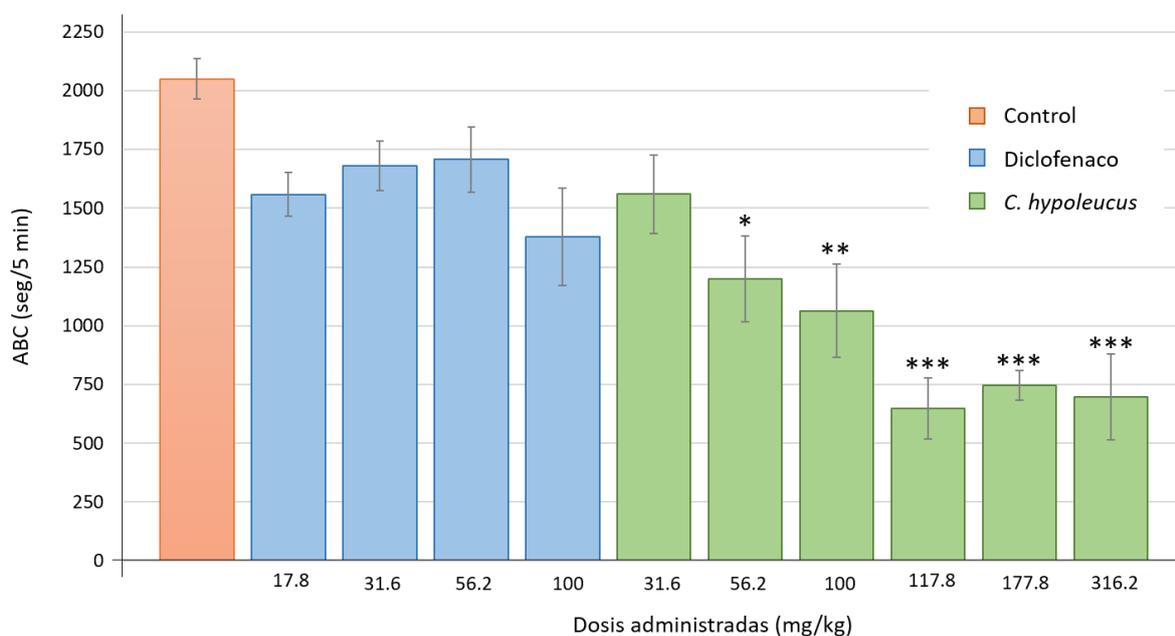


Figura 7. Área bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo en la fase II (10-60 minutos) de los diferentes grupos tratados, control (rojo), diclofenaco a diferentes concentraciones (azul) y extracto etanólico de *C. hypoleucus* (verde). Los resultados se expresan como promedios de un total de ocho lecturas individuales \pm error estándar de la media; * $p=0.008$, ** $p=0.001$, *** $p<0.001$, con respecto al grupo control (ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey).

Con los resultados obtenidos del área bajo la curva del tiempo promedio de lamidas, se calculó el porcentaje de inhibición, siguiendo la fórmula mencionada en el punto 6.3, dando como resultado la figura 8, en la cual, se observa que los grupos tratados con diclofenaco y con el extracto etanólico de *C. hypoleucus* presentaron actividad antinociceptiva en la fase tónica tardía. Los resultados obtenidos demuestran la actividad antinociceptiva del extracto etanólico de *C. hypoleucus*, teniendo un efecto mínimo a la dosis de 31.6 mg/kg ($23.95 \pm 6.87\%$) y un efecto máximo a la dosis de 117.8 mg/kg ($68.35 \pm 6.36\%$), con respecto al grupo control.

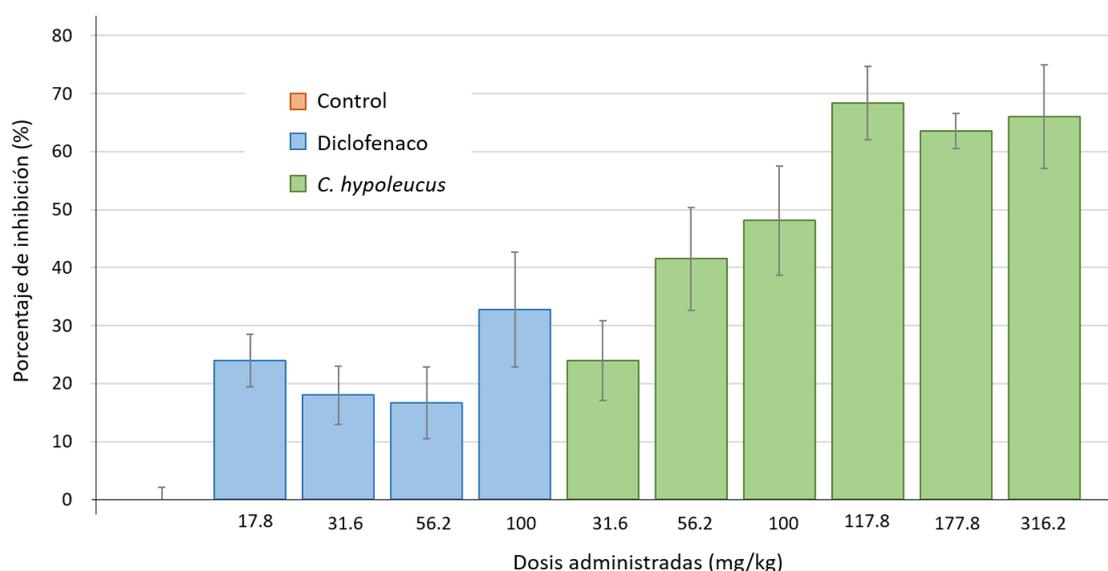


Figura 8. Efecto antinociceptivo en la Fase II, expresado como porcentaje de inhibición de los diferentes grupos, tratados con respecto al grupo control (formalina al 1%). Los resultados se expresan como promedios de un total de ocho lecturas individuales \pm error estándar de la media.

7.1.2 Incidencia de sacudidas espontáneas

Al graficar el número de sacudidas espontáneas en función del tiempo, se obtuvo el curso temporal de cada dosis empleada, dando como resultado la figura 9 donde se observan los resultados obtenidos del grupo control, diclofenaco (17.8, 31.6, 56.2 y 100 mg/kg) y el extracto etanólico de *Croton hypoleucus* (31.6, 56.2, 100, 117.8, 177.8 y 316.2 mg/kg). La administración oral del extracto etanólico de *Croton hypoleucus* a diferentes concentraciones, demostró disminución en el número de sacudidas con respecto al grupo control, similar a las observadas en los grupos tratados con diferentes concentraciones de diclofenaco.

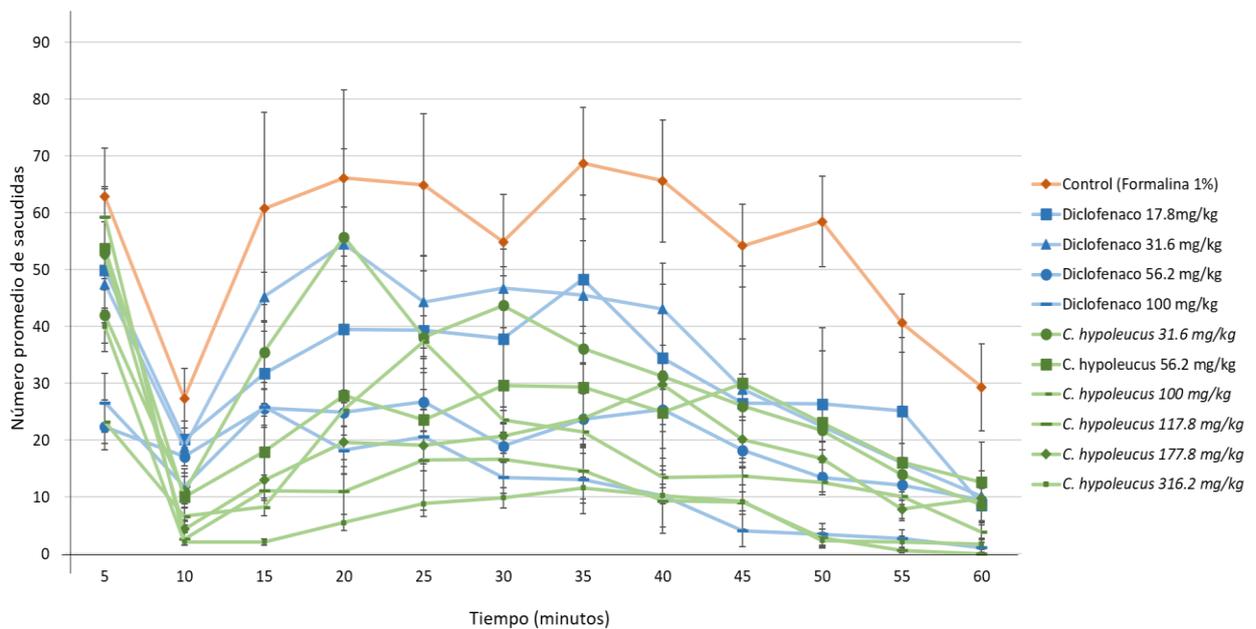


Figura 9. Cursos temporales de las administraciones de los diferentes tratamientos administrados.

Control en rojo (formalina 1%), diclofenaco en azul (17.8, 31.6, 56.2 y 100 mg/kg) y el extracto etanólico de *Croton hypoleucus* en verde (31.6, 56.2, 100, 117.8, 177.8 y 316.2 mg/kg). Los datos se expresan como promedios \pm error estándar de ocho lecturas individuales.

Al calcular el área bajo la curva (ABC) del curso temporal en la fase tónica tardía (10-60 minutos), se pudo observar de manera más clara el efecto antinociceptivo de cada tratamiento administrado, dando como resultado la figura 10 donde se observa que el grupo control es el grupo con mayor ABC (2593.44 ± 322.89). Los grupos tratados con diclofenaco (17.8, 31.6, 56.2 y 100 mg/kg) mostraron una respuesta antinociceptiva, dando como resultado la disminución en cada grupo del ABC con respecto al grupo control (1489.06 ± 524.61 , 1647.19 ± 259.38 , 905.94 ± 108.66 , 489.13 ± 138.12 , respectivamente). Los grupos tratados con el extracto etanólico de *C. hypoleucus* (31.6, 56.2, 100, 117.8, 177.8 y 316.2 mg/kg) también mostraron disminución en el área bajo la curva con respecto al grupo control (1444.06 ± 133.88 , 1099.69 ± 520.43 , 819.69 ± 39.66 , 431.56 ± 185.78 , 846.25 ± 123.28 , 309.06 ± 47.28 , respectivamente).

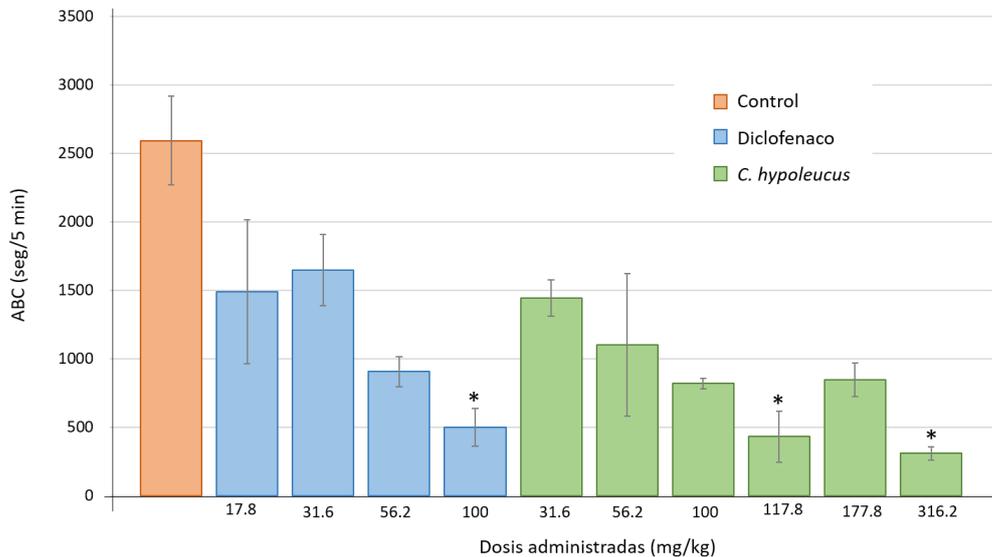


Figura 10. Área bajo la curva del curso temporal del efecto antinociceptivo en la fase II (10-60 minutos) de los diferentes grupos tratados, control (rojo), diclofenaco a diferentes concentraciones (azul) y extracto etanólico de *C. hypoleucus* (verde). Los resultados se expresan como promedios de un total de ocho lecturas individuales \pm error estándar de la media; * $p < 0.05$, con respecto al grupo control (ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey).

Con los resultados obtenidos del área bajo la curva del curso temporal del número promedio de sacudidas, se calculó el porcentaje de inhibición, siguiendo la fórmula mencionada en el punto 6.3, dando como resultado la figura 11, en la cual, se observa que los grupos tratados con diclofenaco y con el extracto etanólico de *C. hypoleucus* si presentaron actividad antinociceptiva en la fase tónica tardía. Los resultados obtenidos demuestran la actividad antinociceptiva del extracto etanólico de *C. hypoleucus*, teniendo un efecto mínimo a la dosis de 31.6 mg/kg ($44.32 \pm 5.80\%$) y un efecto máximo a la dosis de 316.2 mg/kg ($88.08 \pm 5.84\%$), con respecto al grupo control.

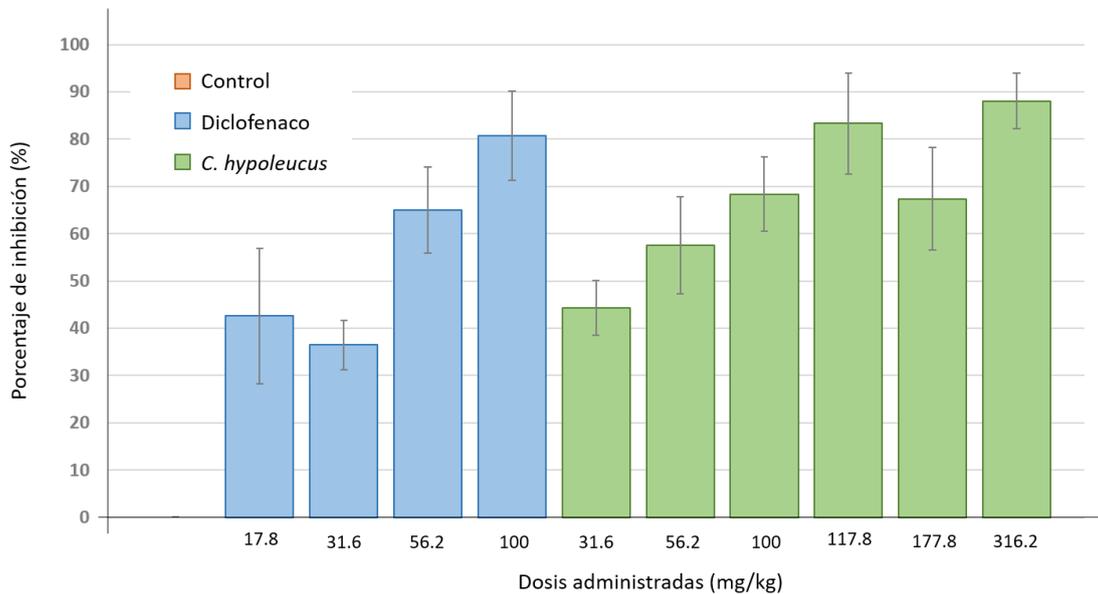


Figura 11. Efecto antinociceptivo en la Fase II, expresado como porcentaje de inhibición de los diferentes grupos tratados, con respecto al grupo control (formalina al 1%). Los resultados se expresan como promedios de un total de ocho lecturas individuales \pm error estándar de la media.

7.2 Evaluación estadística

En la tabla 2 se resumen los datos obtenidos de la evaluación estadística de los resultados de la fase tónica tardía (10-60 minutos) en la prueba de formalina en ratas. Se observa que, en el criterio de tiempo acumulado de lamidas, todos los grupos tratados con el extracto etanólico de *C. hypoleucus*, a excepción de la dosis de 31.6 mg/kg, poseen actividad nociceptiva estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo control, principalmente las dosis de 117.8, 177.8 y 316.2 mg/kg ($p < 0.001$). En cuanto al criterio de número de sacudidas, se observa que, los grupos tratados con el extracto etanólico de *C. hypoleucus* en dosis de 117.8 y 316.2 mg/kg y el grupo tratado con diclofenaco a dosis de 100 mg/kg, poseen actividad nociceptiva estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo control.

Tabla 2. Evaluación estadística de los resultados obtenidos en la fase tónica tardía de la prueba de formalina en ratas.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo acumulado de lamidas		Incidencia de sacudidas	
		ABC ^a	Significancia (p)	ABC ^a	Significancia (p)
Diclofenaco	17.8	1557.93 ± 93.02	0.492	1489.06 ± 524.61	
	31.6	1680.85 ± 105.13	0.855	1647.19 ± 259.38	
	56.2	1707.51 ± 138.65	0.907	905.94 ± 108.66	
	100	1378.27 ± 208.14	0.094	498.13 ± 138.12	<0.05*
C. hypoleucus	31.6	1559.27 ± 166.23	0.497	1444.06 ± 133.88	
	56.2	1199.35 ± 182.99	0.008*	1099.69 ± 520.43	
	100	1063.98 ± 197.21	0.001*	819.69 ± 39.66	
	117.8	648.99 ± 130.32	<0.001*	431.56 ± 185.78	<0.05*
	177.8	746.33 ± 61.64	<0.001*	846.25 ± 123.28	
	316.2	696.56 ± 183.53	<0.001*	309.06 ± 47.28	<0.05*

^a Área bajo la curva del curso temporal de la Fase II de la prueba de formalina (10-60 minutos) ± el error estándar de la media.

* p es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95% con respecto al grupo control.

8 DISCUSIÓN

El género *Croton* perteneciente a la familia de las Euphorbiaceae, comprende cerca de 1300 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales; las plantas pertenecientes a este género son conocidas por producir furanoditerpenoides (un grupo de diterpenoides que contienen en su estructura uno o más anillos de furano) a los cuales se les atribuyen actividades biológicas como antiinflamatorio, antinociceptivo, antiviral, antimicrobiano, entre otras (Velázquez-Jiménez et al., 2018). El presente trabajo demuestra la actividad antinociceptiva del extracto etanólico de *Croton hypoleucus*.

La prueba de formalina ha sido utilizada ampliamente para la evaluación de las respuestas relacionadas con el dolor, siendo las ratas y ratones, los modelos animales más utilizados. La inyección subcutánea de formalina en la pata trasera provoca comportamientos de estremecimiento espontáneos que son relacionados con el dolor. Las respuestas consisten en una fase aguda (Fase I) la cual es de corta duración y se cree que refleja la actividad de los nociceptores aferentes de la fibra C. La fase tardía (Fase II) se cree que es el resultado de la sensibilización central de las neuronas del asta dorsal como resultado de la entrada de los estímulos nociceptivos de la fibra C durante la fase aguda (Gong, et al., 2014)

Como fármaco de referencia se utilizó diclofenaco ya que tiene propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas, y se ha demostrado que es eficaz en el tratamiento del dolor agudo y crónico. Al ser un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), ejerce su acción mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas al inhibir la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Gan, 2010). De acuerdo con los resultados obtenidos, el diclofenaco, a diferentes dosis (17.8, 31.6, 56.2 y 100 mg/kg) demostró tener actividad antinociceptiva en la Fase II, sin embargo, únicamente la dosis más alta presentó diferencia significativa con respecto al grupo control.

Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Croton hypoleucus* a diferentes dosis (31.6, 56.2, 100, 117.8, 177.8 y 316.2 mg/kg) mostró disminución en el tiempo de lamida en la Fase II, alcanzando la

inhibición máxima a la dosis de 117.8 mg/kg ($68.35 \pm 6.36\%$), así como disminución en el número de sacudidas en la Fase II, alcanzando el efecto máximo a la dosis de 316.2 mg/kg ($88.08 \pm 5.84\%$), con respecto al grupo control. De acuerdo con los resultados, las dosis de 117.8, 177.8 y 316.8 mostraron tener un mayor porcentaje de inhibición y, tomando en cuenta los resultados mostrados en la tabla 2, se puede observar que son significativamente diferentes con respecto al grupo control, por lo tanto, se confirma el efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *C. hypoleucus* y se corrobora la eficacia de su uso en la medicina tradicional.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se propone que la actividad antinociceptiva de *C. hypoleucus* sea a nivel periférico ya que presenta resultados satisfactorios en la Fase II de la prueba de formalina en rata.

9 CONCLUSIÓN

El tratamiento farmacológico para el dolor es complejo ya que se deben considerar las características del fármaco y del paciente; a pesar de la frecuencia y severidad del dolor, las opciones de tratamiento farmacológico no son satisfactorias, por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas para terapias contra el dolor, basadas en la medicina tradicional ha sido de gran interés.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el extracto etanólico de *Croton hypoleucus* en el modelo de formalina en rata, demuestra propiedades antinociceptivas a nivel periférico, lo que proporciona un sustento científico para su uso en la medicina tradicional para el alivio del dolor.

10 REFERENCIAS

- Abd-Elseyed A., Deer T.R. (2019) Different Types of Pain. In: Abd-Elseyed A. (eds) Pain. *Springer, Cham*.
- Bardin, L., Tarayre, J. P., Koek, W., & Colpaert, F. C. (2001). In the formalin model of tonic nociceptive pain, 8-OH.DPAT produces 5-HT_{1A} receptor-mediated, behaviorally specific analgesia. *European journal of pharmacology*. 42(1):109-114.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 139(2): 267–284.
- Cordeiro, K.W., Felipe, J.L., Malange, K.F., do Prado, P.R., de Oliveira Figueiredo, P., Garcez, F.R., de Cássia Freitas, K., Garcez, W.S., Toffoli-Kadri, M.C. (2016) Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *J Ethnopharmacol*. 183:128-135.
- Costigan, M., & Woolf, C. J. (2000). Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*. 1(3 Suppl):35–44.
- De Aluja, A. S. (2002). Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Méd Méx*. 138(3):295-298.
- Fishman, S. M. (2005). Opioid side effects, addiction, and anti-inflammatory medications. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*. 19(1):51–55.
- Gan T. J. (2010). Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current medical research and opinión*. 26(7):1715–1731.
- Gong, N., Xiao, Q., Zhu, B., Zhang, C. Y., Wang, Y. C., Fan, H., Ma, A. N. & Wang, Y. X. (2014). Activation of spinal glucagon-like peptide-1 receptors specifically suppresses pain hypersensitivity. *J Neurosci*. 34(15): 5322-5334.
- Iwakiri, R. (2007). NSAIDs and its gastrointestinal side effects: relation of NSAIDs variety and influence of concomitant medicine. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*. 65(10):1776–1780.
- López-Muñoz, F., Moreno-Rocha, L.A., Moreno-T, F., Domínguez-Ramírez, A. & Bravo, G. (2006). Análisis preclínico (rata) de efectos antinociceptivos de asociación entre tramadol y acetaminofeno. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 29(4):215-220.

- Mizushima, T. (2008). Strategy for development of NSAIDs with lower risk for side effects. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 128(2):255–261.
- National-Research-Council. (2010). Guide for the care and use of laboratory animals. *National Academic Press*.
- Oliveira, T., Morais, S.R., Sá, S., Oliveira, M.G., Florentino, I.F., Silva, D., Carvalho, V.V., Silva, V., Vaz, B.G., Sabino, J.R., Costa, E.A., Paula, J.R. (2017) Antinociceptive, anti-inflammatory and anxiolytic-like effects of the ethanolic extract, fractions and Hibalactone isolated from *Hydrocotyle umbellata* L. (Acariçoba) - Araliaceae. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 95:837-846.
- Orr, P. M., Shank, B. C., & Black, A. C. (2017). The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29(4): 407–418.
- Przybyła, G. W., Szychowski, K. A., & Gmiński, J. (2020). Paracetamol - an old drug with new mechanisms of action. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 00:1-17.
- Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Lanata, L., & Bagnasco, M. (2013). Efficacy of ketoprofen vs. ibuprofen and diclofenac: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 31(5):731–738
- Urrutia-Hernández, T. A., Santos-López, J. A., Benedí, J., Sánchez-Muniz, F. J., Velázquez-González, C., De la O-Arciniega, M., Jaramillo-Morales, O. A., & Bautista, M. (2019). Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Croton hypoleucus Extract in an Induced-Necrosis Model in Rats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(14): 2533.
- Varrassi, G., Alon, E., Bagnasco, M., Lanata, L., Mayoral-Rojals, V., Paladini, A., Pergolizzi, J., Perrot, S., Scarpignato, C., Tölle, T. (2019) Towards and effective and safe treatment of inflammatory pain: a delphi-guided expert consensus. *Adv Ther*. 36:2618-2637.
- Velázquez-Jiménez, R., Vargas-Mendoza, D., Gayosso-de-Lucio, J.A., González-Montiel, S., Villagómez-Ibarra, J.R. (2018) Three novel epoxy-clerodanes bearing a furan ring from Croton hypoleucus. *Phytochemistry Letters*. 24:21-26.

- World Health Organization (WHO). *The World Medicines Situation, Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges*; WHO: Geneva, Switzerland, 2011.
- Wen, S., Muñoz, J., Mancilla, M., Bornhardt, T., Riveros, A., & Iturriaga, V. (2020). Mecanismos de Modulación Central del Dolor: Revisión de la Literatura. *International Journal of Morphology*, 38(6):1803–1809.
- Woolf, C. (2010) What is this thing called pain?. *J Clin Invest.* 120(11):3742-3744.
- Xu, W.-H., Liu, W.-Y., & Liang, Q. (2018). Chemical Constituents from Croton Species and Their Biological Activities. *Molecules*, 23(9):2333.
- Zhao, J., Fang, F., Yu, L., Wang, G., & Yang, L. (2012). Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of Croton crassifolius ethanol extract. *Journal of ethnopharmacology*, 142(2):367–373.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16(2):109-110.

“Efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Croton hypoleucus* (Palo blanco)”



Vo. Bo. Asesor
Dr. Moreno Rocha Luis Alfonso